

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-078769

(43)Date of publication of application : 27.03.2001

---

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

---

(21)Application number : 11-262255 (71)Applicant : MARUYAMA ATSUSHI

(22)Date of filing : 16.09.1999 (72)Inventor : MARUYAMA ATSUSHI  
KIN ENSHO  
AKAIKE TOSHIHIRO

---

(54) CATIONIC HIGH MOLECULAR PREPARATION FOR IMPROVING EXCHANGE BETWEEN NUCLEOTIDE SEQUENCES

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To prepare a preparation capable of enabling the omission or shortening of a reaction process, or the improvement of gene expression-regulating function, without requiring denaturation step such as heating of a DNA and an RNA by using a specific cationic polymer as an active ingredient.

SOLUTION: This preparation contains a cationic polymer constituted of a main chain derived from a polylysine and a graft-type side chain derived from a dextrin or a polyethylene glycol as an active ingredient. The preparation promotes the exchange reaction of a nucleotide sequence at a specific site in a double stranded DNA or an RNA hybridizing with a nucleotide sequence homologous to the sequence, such as fluorescent in situ hybridization, polymerase chain reaction, reverse transcription PCR (RT-PCR) or the hybridization of a DNA chip with a target DNA having a double stranded structure.

---

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

07.09.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The preparation object which makes an active principle the cationic macromolecule for promoting the exchange reaction by the nucleotide sequence of homologous in this array of the nucleotide sequence of the specific part in duplex deoxyribonucleic acid or RNA.

[Claim 2] The preparation object according to claim 1 with which a cationic giant molecule has a cationic radical in the repeating unit of a principal chain.

[Claim 3] The preparation object according to claim 1 or 2 which has the graft mold side-chain structure where side-chain qualification of the cationic macromolecule was carried out with the hydrophilic macromolecule.

[Claim 4] The preparation object according to claim 1 which consists of a principal chain with which a cationic giant molecule originates in the poly lysine, and a graft mold side chain originating in a dextran or a polyethylene glycol.

[Claim 5] Exchange reaction is fluorescence. in Preparation object according to claim 1 to 4 which is what is produced on the occasion of the hybridization of situ hybridization (FISH), polymerase chain reaction, reverse transcription PCR (RT-PCR) or a DNA chip, and DNA that has label duplex chain structure.

[Claim 6] The preparation object according to claim 1 to 4 which is what exchange by the single-stranded array as which exchange reaction is chosen from the antisense DNA or specific RNA, and the specific ribozyme of a nucleotide sequence in the RNA chain which has duplex chain structure produces.

[Claim 7] The preparation object according to claim 1 to 4 which is what prepares gene expression and a duplicate when exchange reaction arises according to the nucleotide sequence of homologous in the specific nucleotide sequence and this specific array in the DNA strand which has duplex chain structure.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the preparation object of the cationic macromolecule for using it in the case of actuation of duplex deoxyribonucleic acid or RNA. It is related with the preparation object of the cationic macromolecule more specifically used in case the nucleotide sequence of the specific part in a duplex chain DNA strand or RNA chain is exchanged by the homologous nucleotide sequence (it is a complementary array to another DNA or the correspondence part of RNA chain.).

[0002]

[Description of the Prior Art] Homonous recombination is reorganization of the genetic information in duplex deoxyribonucleic acid, and is a living thing phenomenon universally performed in living world for preservation of genetic information, and a duplicate. A homologous base sequence is discovered in the homonous recombination from a countless base sequence, and the exchange process of homologous chains is included in it. By today Within Escherichia coli, these functions The protein (RecA) to manage is identified (). [ Mol.Gen.Genet., 155, 77-85(1977).Pro.Natl.Acad.Sci.USA, 74, ] [ 5280-5284 (1977)-ro.Natl.Acad ] Sci.USA, 77, 2611-2615 (1980), etc., The protein which has the same function with similar structure is found out in the large range, such as a procaryote, eukaryotes (Cell, 69,457-470 (1992), etc.), and a virus (Nucl.Acids Res., 13, 7473-7481 (1985)). Moreover, these RecA(s) protein is becoming clear [ participating in homonous recombination deeply ]. It combines with a single-strand DNA, and RecA protein forms complex, and discovers the homologous base sequence between this single-strand DNA and duplex deoxyribonucleic acid. if a homologous array is found out, pass complex (Mie chain) formation with a single-strand DNA and duplex deoxyribonucleic acid -- DNA is emitted (Tanpakushitsu Kakusan Koso.44,631-642 (1999)). Thus, RecA forms the heteroduplex which exchanged one side of a duplex chain, and goes. ATP and Mg<sup>2+</sup> are required for this process as cofactor.

[0003] On the other hand, the principle of the DNA strand exchange on the duplex deoxyribonucleic acid mentioned above is an important process in the polymerase chain reaction (PCR) magnification process with higher order structure from the reverse transcription PCR (RT-PCR) and the plasmid DNA from RNA. When specifically making possible hybridization of the primer to the complementary array on the single-stranded RNA chain which has these duplex deoxyribonucleic acid and higher order structure, and the composition of a magnification product further made into the purpose are completed, it is necessary to make hybridization of the following primer possible by heating by making the single-strand DNA or single stranded RNA used as mold dissociate from the duplex deoxyribonucleic acid or the double-stranded-RNA chain which is a magnification product.

[0004] As an example which attained DNA exchange of duplex deoxyribonucleic acid artificially, without performing denaturation processes, such as heating, it has a peptide nucleic acid (PNA) (Nature Biotechnology, 14.1700 1704 (1996), etc.), and the various report of new DNA and the genome analysis method using this PNA is carried out. However, although PNA promotes DNA strand exchange under low ion

concentration, under physiological ion concentration conditions, the engine performance falls extremely. Moreover, the present condition is there being a problem used as substrates, such as DNA polymerase, RNA polymerase, and a ligase, unlike the natural molds DNA and RNA, and having brought constraint to DNA and genome analysis by PNA.

[0005] There is peptide-DNA complex as an example which conquered such a trouble of PNA (J. Am.Chem.Soc., 121, 2012-2020 (1999)). However, under Mg ion existence, since DNA strand exchange activity is checked, concomitant use with Mg ion-dependent enzymes, such as DNA polymerase, is restricted.

[0006] As mentioned above, the function which RecA is performing in the living body is copied, and what can demonstrate sufficient function under various conditions is not reported.

[0007] On the other hand, it was reported by the researchers who make this invention person the start recently that the copolymer of a comb mold (comb-type) promotes formation and stabilization of a DNA duplex chain or the Mie chain under conditions equivalent to in the living body (Bioconjugate Chem., 8, 3-6(1997);Nucleic Acids Sym.Ser.No.39,133-134(1998);Bioconjugate Chem., 9,292-299 (1998)). Moreover, in the paper of the above-mentioned last, it is also suggested that DNA strand Hazama's hybridization is promoted for the above-mentioned copolymer, especially the copolymer graft-ized highly in a low ionic strength medium.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention aims at offering a means which enables abbreviation of a reaction process or compaction, and relaxation of other conditions, without needing denaturation processes, such as DNA and heating of RNA, in case the nucleotide sequence in the specific part in duplex deoxyribonucleic acid or RNA is artificially exchanged for it by the homologous nucleotide sequence.

[0009]

[Means for Solving the Problem] As mentioned above, a certain fixed comb mold copolymer promoting formation and stabilization of a DNA duplex chain or the Mie chain under conditions equivalent to in the living body, and also promoting DNA strand Hazama's hybridization moreover is known. however, \*\* -- the operations with the cationic macromolecule above although the Mie chain [ like ] DNA is stabilized by the specific copolymer which makes this copolymer the start -- or it was found out this time that chain exchange of Hazama with a single-strand DNA, RNA and duplex deoxyribonucleic acid, or RNA can also be promoted separately.

[0010] namely, this invention -- \*\* -- it is based on knowledge [ like ].

[0011] Therefore, according to this invention, the preparation object which makes an active principle the cationic macromolecule for promoting the exchange reaction by the nucleotide sequence of homologous in this array of the nucleotide sequence of the specific part in duplex deoxyribonucleic acid or RNA is offered.

[0012]

[The desirable mode for inventing] Duplex deoxyribonucleic acid or RNA means the chain which can maintain the higher order structure formed between DNA formed of the involution of A, a uracil (U), and G and C, or between RNA by the complementary base (or nucleotide) pair, for example, DNA, by the adenine (A), the thymine (T) and a guanine (G) and a cytosine (C), and RNA. Such DNA or RNA may exist in the piece of a body tissue on the context of this invention, without being isolated even if isolated from a biogenic substance. Of course, the compounded duplex deoxyribonucleic acid or RNA is also included.

[0013] \*\* -- about the end of DNA which became the nucleotide sequence of the specific part in DNA or RNA straight chain-like, or RNA -- about pars intermedia -- etc. -- you may be the nucleotide sequence of what kind of part. [ like ] Moreover, it means that the base which constitutes an array is substantially the same as the nucleotide sequence of homologous in this array. Substantially, the nucleotide sequence of the above-mentioned specific part and a homologous array of as opposed to [ being the same ] it have the same each of A, T, G, and C in the order of an array which continues at least 95%, or the case where T is placed and replaced with U in such an array is said.

[0014] Therefore, it has the intention of exchange reaction being exchanged by the single-strand DNA or RNA to which the nucleotide sequence of a specific part [ in / in the duplex deoxyribonucleic acid or RNA which consists of two complementary chains / one of two chains ] has the nucleotide sequence of homologous in it. The case where it is exchanged as a format of concrete exchange according to the nucleotide sequence of homologous [ in / in the nucleotide sequence of the specific part of duplex deoxyribonucleic acid / a single-strand DNA or RNA ], or is exchanged according to the nucleotide sequence of homologous [ in / in the nucleotide sequence of the specific part of double stranded RNA / a single-strand DNA or RNA ] is mentioned.

[0015] Although the nucleotide sequence of the homologous in a single-strand DNA or RNA occupies a part even if it occupies this single-strand DNA or the whole RNA molecule, it has strongly the intention of what generally occupies the whole.

[0016] Exchange or exchange reaction means that substitution reconstruction of the

nucleotide sequence of duplex deoxyribonucleic acid or the specific part of RNA is only carried out by the nucleotide sequence at the single-strand DNA or RNA of homologous at this array, and it is not accompanied by \*\*\*\*\* of the nucleotide sequence of a specific part by birth.

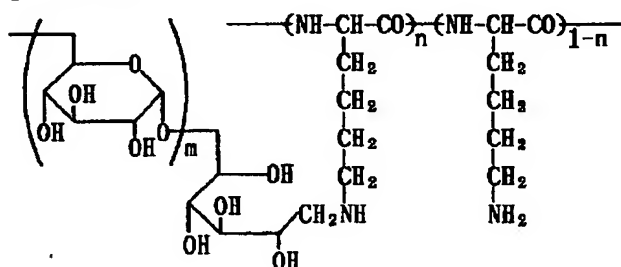
[0017] If this invention is followed, such exchange reaction can be efficiently caused under existence of a cationic macromolecule. Although you may be what kind of polymer as a cationic macromolecule as long as it \*\* to the above-mentioned exchange reaction, the cationic homopolymer and copolymer which originate in the monomer which can form cationic radicals, such as synthetic monomers, such as sugar, such as amino acid, such as a lysine, an arginine, and a histidine, and a glucosamine, ethyleneimine, diethylamino ethyl methacrylate, and a dimethylaminoethyl METAKUNO rate, for example can be mentioned.

[0018] As for a cationic giant molecule, what has the graft mold structure where side-chain qualification of the further above-mentioned cationic homopolymer or copolymer was carried out with the hydrophilic giant molecule is desirable. As such a side chain (graft chain), water-soluble polyalkylene glycols, such as a polyethylene glycol, Water-soluble polysaccharides, such as a dextran, a pullulan, an amylose, and arabinogalactan, The water-soluble polyamino acid containing hydrophilic amino acids, such as a serine, an asparagine, a glutamine, and threonine, The water soluble polymer compounded using acrylamide and its derivative as a monomer, The water soluble polymer which uses the derivative (an example, hydroxyethyl methacrylate) for a methacrylic acid and an acrylic-acid list as a monomer, and is compounded, What is formed with one or more sorts of water soluble polymers chosen from the group which consists of polyvinyl alcohol and its derivative can be mentioned.

[0019] As a more desirable cationic macromolecule, it is Above Bioconjugate, for example. Chem. and the thing expressed with the following general formula which is indicated by 9,292-299 (1998) can also be mentioned.

[0020]

[Formula 1]

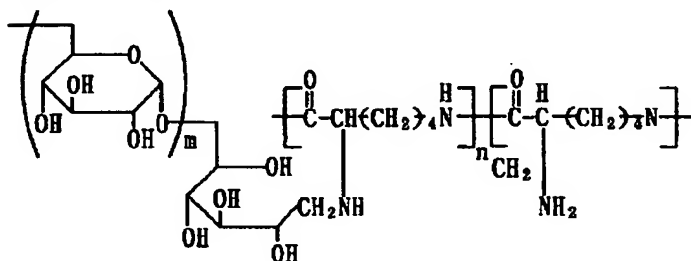


[0021] Dextran side-chain qualification alpha-Pori (L-lysine)

(It is hereafter written as alpha-PLL-g-Dex)

[0022]

[Formula 2]

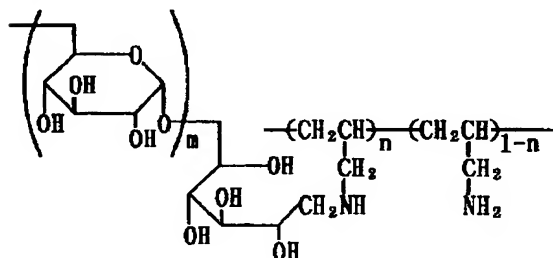


[0023] Dextran side-chain qualification epsilon-Pori (L-lysine)

(It is hereafter written as epsilon-PLL-g-Dex)

[0024]

[Formula 3]



[0025] Dextran side-chain qualified type poly allylamine (it is hereafter written as PAA-g-Dex)

Alpha-PLL-g-Dex and epsilon-PLL-g-Dex can use it preferably in this invention especially among the above-mentioned cationic macromolecules.

[0026] \*\* -- since the optimal value is changed by the concrete purpose of use, it cannot limit, but if the molecular weight of a cationic macromolecule [ like ], the chain length of side-chain qualification radical itself, and extent of a graft are these contractors, they can choose each optimum value as reference for the below-mentioned example -- I will come out.

[0027] although the preparation object which makes the above-mentioned cationic macromolecule an active principle will be offered if this invention is followed -- \*\* -- unless it has a bad influence on the target exchange reaction, the crude object of the compounded macromolecule or the refined macromolecule, and the need can constitute a preparation object [ like ] from a buffer, a physiological saline, etc.



Moreover, macromolecules may be one sort or two sorts or more of mixture.

[0028] In the exchange reaction according to this invention, generally, such a cationic macromolecule is chosen so that the electric charge ratio of a cationic radical to the phosphate in \*\* (single-stranded +2 heavy chain) DNA and RNA with which exchange reaction is presented may be preferably set to 0.5–1000 0.1 or more. As for the mole fraction of the single-strand DNA to the duplex deoxyribonucleic acid or RNA with which exchange reaction-ed is presented on the other hand, or RNA, choosing so that about 5 may be exceeded is advantageous.

[0029] Exchange reaction can be performed under temperature in which duplex deoxyribonucleic acid or RNA does not carry out thermal denaturation, and it can be performed, without needing cofactors, such as ATP and  $Mg^{2+}$ . As for the above-mentioned temperature, it is desirable that it is the physiologically permissible temperature which a bad influence does not produce into a living thing cell etc., for example, about 5 degrees C – about 40 degrees C.

[0030] The cationic giant molecule according to this invention can exchange efficiently the nucleotide sequence of the specific part in duplex deoxyribonucleic acid or RNA by the nucleotide sequence of the homologous of a single-strand DNA or RNA under the above-mentioned conditions. As long as an oligonucleotide is 5 or more mers, what kind of chain length's thing is theoretically sufficient as it. In addition, this invention is preferably applicable to 10 or more mers the array of 500 or less mer. Therefore, the preparation object of the cationic giant molecule of this invention is PCR using the function of the hybridization of the oligonucleotide which supports duplex deoxyribonucleic acid, the primer to RNA, a probe, an indicator, physic of itself known, etc., the primer subsequently to duplex deoxyribonucleic acid or the specific part of RNA hybridized, or a probe or an oligonucleotide and a RT-PCR process and the process using a DNA chip, and Fluorescence in. In the nucleic-acid analysis using situ hybridization, it is useful.

[0031] Moreover, the cationic macromolecule according to this invention also when promoting exchange with the antisense oligonucleotide which includes the complementary sequence to a specific part to up to mRNA with double chain structure, a ribozyme, a deoxy ribozyme, and the oligonucleotide for 3 heavy-chain formation and raising the gene control function of these oligonucleotides is useful. Furthermore, by producing exchange of a complementary nucleotide chain with the specific part on a genomic DNA duplex chain, also when controlling a copy (adjusting association of DNA affinity protein), and an imprint course, it is useful.

[0032]

[Example] Although the exchange reaction of a duplex chain oligonucleotide and a single-stranded oligonucleotide is mentioned and this invention is hereafter explained concretely in order to make an understanding easy, these reactions are understood to be those to which Hazama with long-chain duplex deoxyribonucleic acid, RNA and a single-strand DNA, or RNA happens similarly.

[0033] Example 1: It is Hokkaido about the oligonucleotide of the DNA strand exchange following table -1 between the single-strand DNAs and duplex deoxyribonucleic acid by alpha-PLL-g-Dex. System It purchased from Science and high performance chromatography refined. A refined oligonucleotide is dissolved in the phosphate buffer (0.5mM EDTA, 150mMNaCl.pH7.2) of 10mM(s), and it is UV. By carrying out UV absorption measurement, DNA concentration was determined in spectroscopy (BeckmanDU 600). Duplex deoxyribonucleic acid was prepared by carrying out equimolar (1.54microM) mixing and carrying out annealing of the DNA which has E-1 of Table -1, and the complementary sequence of E-2.

[0034]

[Table 1]

表-1 実際に使用したオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド		配列
ODN	E-1	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
ODN	E-2	3'-TACCACTCGTTCCCGCTCCT-5'-FITC
ODN	E-3	5'-TCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3'

[0035] Alpha-PLL-g-Dex is Above Bioconjugate about the composition, purification, and analysis. Chem., 8, 3-6, and the cationic polymer that were obtained by carrying out according to (1997) were used.

[0036] The DNA exchange experiment was conducted in the following procedures. The single-strand DNA of a constant rate was added in 10micro of duplex-deoxyribonucleic-acid (duplex) solutions L of 1.54microM, and the DNA solution was prepared so that the mole fraction of [single-strand DNA]/[a duplex chain] might be set to 5. A mole ratio [ as opposed to the phosphate radical in DNA of the polymer amino group to this DNA mixed solution ] [0037]

[Equation 1]

( [アミノ基]<sub>ポリマー</sub> / [ホスフェート]<sub>DNA</sub> の荷電比 )

[0038] The polymer was added so that it might become \*\* 2. Furthermore, MgCl2 was

added so that it might finally be set to 10mM(s), and buffer solution was added so that each DNA solution might be set to 25microL. Each of this sample solution was incubated at 37 degrees C and 15 degrees C. DNA strand exchange reaction was suspended by ice-cooling after [ predetermined time of ] sample CHABU. Then, the salmon sperm DNA (5microL, 1.7 mg/mL) was added the making DNA and a polymer dissociate purpose. The amount of DNA exchange is Biofil about the fraction of the duplex deoxyribonucleic acid by which fluorescent labeling was carried out by carrying out polyacrylamide electrophoresis (100 V/cm, 2 hours) of the sample 13% in TBE buffer solution. Bioimage It asked by analyzing by Analyser. Moreover, the rate of DNA exchange was computed by the following formulas -1.

[Formula 1]

Rate (%) of DNA strand exchange =  $(1 - [\text{fluorescence intensity of double chain after reaction}] / [\text{fluorescence intensity of double chain before reaction}]) \times \{(\text{mol of double chain number} + \text{single-stranded mol number}) / (\text{single-stranded mol number})\} \times 100$   
 result is shown in drawing 1 . In 37 degrees C, when alpha-PLL-g-Dex did not exist, even if incubated for 30 minutes, even in the incubation for 5 minutes, the rate of DNA strand exchange arrived at the bottom of alpha-PLL-g-Dex existence to 90% to having been exchanged by the homonous single-strand DNA and 30% of the FITC-label DNA in duplex deoxyribonucleic acid having been a request. Moreover, when the same experiment was conducted at 15 degrees C, and alpha-PLL-g-Dex did not exist, alpha-PLL-g-Dex arrived at the bottom of existence in 1 hour at 50% of rates of DNA exchange to having been required for 24 hours or more reaching 50% of rates of DNA exchange.

[0039] Example 2: About the same DNA as the effectiveness example 1 of Mg ion exerted on the DNA strand exchange facilitatory effect of alpha-PLL-g-Dex, it is 10mM. It prepared so that it might become the ratio of various single-strand DNA / double chains DNA to the buffer solution which does not contain MgCl<sub>2</sub>, and the included buffer solution, and alpha-PLL-g-Dex was added so that an electric charge ratio might be set to 2 to this. This sample was asked for the rate of DNA exchange by the approach equivalent to an example 1 after 30-minute incubation at 37 degrees C.

[0040] Although the result was shown in drawing 2 , it became clear to have the DNA strand exchange promotion ability in which was not concerned with the existence or nonexistence of Mg ion, but alpha-PLL-g-Dex was excellent.

[0041] example 3: -- comparison alpha-PLL and epsilon-PLL of DNA strand exchange by alpha-PLL-g-Dex, alpha-Pori (L-lysine) (alpha-PLL), and epsilon-Pori (L-lysine) (alpha-PLL) -- SIG -- what was purchased from marl DORITCHI Japan and the Wako

Pure Chem industry was used. The same thing as an example 1 was used for alpha-PLL-g-Dex. On the other hand, DNA strand exchange reaction was performed like the example 1 except the addition and reaction time of a polymer. That is, the polymer asked for the rate of DNA strand exchange, after the charge ratio of the polymer which exists in a system and which carries out a DNA pair added so that it might be set to 0.5, and 1 and 5, and it performed exchange reaction in reaction-time 30 minutes.

[0042] A result is shown in drawing 3. In alpha-PLL, 40% and efficiency were low about 60% at alpha-PLL to the charge ratio 0.5 having shown about 90% of rate of exchange in alpha-PLL-g-Dex. However, when any PLL increased the addition and was made into the charge ratio 5, the rate of exchange equivalent to alpha-PLL-g-Dex (at the time of the charge ratio 0.5) was shown.

[0043] Example 4: The comparison above Bioconjugate of the DNA strand exchange promotion ability of alpha-PLL-g-Dex and PAA-g-Dex Alpha-PLL-g-Dex was variously compounded by the approach of a publication to Chem., 8, 3-6, and (1997) (Table -2). Moreover, PAA-g-Dex was compounded by the same technique as alpha-PLL-g-Dex from PAA (Nitto Boseki) and a dextran (Table -3).

[0044]

[Table 2]

表-2 実験に供したPLL-g-Dex

ポリマー	リジン残基に対するDex導入率 (%)
$\alpha$ -PLL-g-Dex (5)	5
$\alpha$ -PLL-g-Dex (8)	8
$\alpha$ -PLL-g-Dex (15)	15

表-3 実験に供したPAA-g-Dex

ポリマー	リジン残基に対するDex導入率 (%)
PAA-g-Dex (5)	5
PAA-g-Dex (8.5)	8.5
PAA-g-Dex (11.5)	11.5

[0045] DNA strand exchange reaction and evaluation were performed like the example 3 except the used polymer (Table -2, Table -3).

[0046] A result is shown in drawing 4. DNA strand exchange promotion ability became

clear [ a high thing ] from PAA-g-Dex to which the direction of alpha-PLL-g-Dex which has alpha-PLL in a principal chain also in which Dex content and which charge ratio has PAA in a principal chain.

[0047] Spermine by which stabilizing the comparison duplex deoxyribonucleic acid of the DNA strand exchange promotion ability of a cationic compound besides example 5: and alpha-PLL-g-Dex is known (and the comparison of the cationic surface active agent with which promoting remarkably the hybridization from single-stranded [ of a complementary DNA chain ] is known, cetyl trimethylammonium Promid (CTAB) (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88.8237-8241 (1991)), alpha-PLL-g-Dex, and epsilon-PLL-g-Dex was performed.) In addition, epsilon-PLL-g-Dex was compounded like alpha-PLL-g-Dex, using epsilon-PLL as starting material. spermine and CTAB -- SIG -- it purchased from marl DORITCHI Japan and DNA strand exchange reaction and evaluation were performed by the same approach as an example 3.

[0048] A result is shown in drawing 5 . It turned out that alpha-PLL-g-Dex promotes chain exchange reaction most effectively.

[0049]

[Effect of the Invention] Above, by this invention, in the hybridization of DNA, such as PCR, and RNA which needed denaturation until now, effectiveness is further raised compaction of a process, relaxation of conditions, and by pressing down nonspecific association, and improvement in the gene expression accommodation function by an antisense DNA/RNA, a ribozyme, the Mie chain plasticity oligonucleotide, etc. accompanying the improvement in functional of a DNA strand and RNA chain exchange, and an incubation is enabled further.

[0050]

[Layout Table]

**\*\*110\*\*** Maruyama Thickness Atsushi and Maruyama <120> Cationic macromolecule preparation object for promoting nucleotide sequence Hazama's exchange <130> 9909038 <160> 2 <210> 1 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 1 atggtgagca agggcgagga 20 <210> 2 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 2 tcctcgccct tgctcaccat20

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-78769

(P2001-78769A)

(43)公開日 平成13年3月27日(2001.3.27)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 15/00

テームコード\*(参考)

Z N A A 4 B 0 2 4

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 9 頁)

(21)出願番号

特願平11-262255

(22)出願日

平成11年9月16日(1999.9.16)

(71)出願人 599131240

丸山 厚

神奈川県横浜市港南区日野6-11 港南台  
住宅13-105

(72)発明者 丸山 厚

神奈川県横浜市港南区日野6-11 港南台  
住宅13-105

(72)発明者 金 園鐘

神奈川県大和市西鶴間1-6-12 ホーユ  
ーバレス第2 404号

(74)代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヌクレオチド配列の間の交換を促進するためのカチオン性高分子調製物

(57)【要約】

【課題】 ヌクレオチド配列間の交換を促進するための手段の提供

【解決手段】 二重鎖DNAあるいはRNAにおける特定部位のヌクレオチド配列の該配列に相同のヌクレオチド配列による交換反応を促進するための、カチオン性高分子を有効成分とする調製物。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 二重鎖DNAあるいはRNAにおける特定部位のヌクレオチド配列の該配列に相同のヌクレオチド配列による交換反応を促進するための、カチオン性高分子を有効成分とする調製物。

【請求項2】 カチオン性高分子が、主鎖の繰返し単位中にカチオン性基を有する請求項1記載の調製物。

【請求項3】 カチオン性高分子が親水性高分子で側鎖修飾されたグラフト型側鎖構造を有する請求項1または2記載の調製物。

【請求項4】 カチオン性高分子がポリリジンに由来する主鎖と、デキストランまたはポリエチレングリコールに由来するグラフト型側鎖とから構成される請求項1記載の調製物。

【請求項5】 交換反応が、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)、ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写PCR (RT-PCR) またはDNAチップと標的の二重鎖構造を有するDNAとのハイブリダイゼーションに際して生じるものである請求項1～4のいずれかに記載の調製物。

【請求項6】 交換反応が、二重鎖構造を有するRNA鎖における特定のヌクレオチド配列のアンチセンスDNAもしくはRNA及びリボザイムから選ばれる単鎖配列による交換が生じるものである請求項1～4のいずれかに記載の調製物。

【請求項7】 交換反応が、二重鎖構造を有するDNA鎖における特定のヌクレオチド配列と該配列に相同のヌクレオチド配列とによって生じることにより、遺伝子の発現及び複製を調製するものである請求項1～4のいずれかに記載の調製物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、二重鎖DNAあるいはRNAの操作の際に使用するためのカチオン性高分子の調製物に関する。より具体的には、二重鎖DNA鎖あるいはRNA鎖における特定部位のヌクレオチド配列を相同なヌクレオチド配列（もう一方のDNAあるいはRNA鎖の対応部位に対しては相補配列である。）で交換する際に用いるカチオン性高分子の調製物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 相同的組換えは、二重鎖DNAにおける遺伝情報の再編成であり、遺伝情報の保存および複製のために生物界では普遍的に行われる生物現象である。その相同的組換えには、無数の塩基配列から相同な塩基配列を探し出し、相同鎖同士の交換プロセスが含まれる。今日までに、大腸菌内でこれらの機能をつかさどるタンパク質 (RecA) が同定され (Mol. Gen. Genet., 155, 77-85 (1977). Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5280-5284 (1977); Pro. Natl. Acad

Sci. USA, 77, 2611-2615 (1980) など)、類似構造を持ち同様の機能を有するタンパク質が原核生物、真核生物 (Cell, 69, 457-470 (1992) など)、ウイルス (Nucl. Acids Res., 13, 7473-7481 (1985)) など広い範囲で見出されている。また、これらRecAタンパク質が、相同的組換えに深く関与していることが明らかとなりつつある。RecAタンパク質は、単鎖DNAに結合し複合体を形成し、この単鎖DNAと二重鎖DNAとの間における相同な塩基配列を探し出す。相同配列を見つけ出すと、単鎖DNAと二重鎖DNAとの複合体（三重鎖）形成を経て、DNAを放出する (Tanpakushitsu Kakusan Koso, 44, 631-642 (1999))。このようにRecAは二重鎖の一方を交換したヘテロ二重鎖を形成して行く。この過程には、ATPおよび $Mg^{2+}$ が補助因子として必要である。

【0003】 一方、上述した二重鎖DNA上のDNA鎖交換の原理は、高次構造を持つRNAからの逆転写PCR (RT-PCR) やプラスミドDNAからのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅過程において重要なプロセスである。具体的には、これら二重鎖DNAや高次構造を有する単鎖RNA鎖上の相補配列へのプライマーのハイブリダイゼーションを可能にすること、さらには、目的とする増幅産物の合成が完了した時点で、加熱することにより鋳型となる単鎖DNAあるいは単鎖RNAを増幅産物である二重鎖DNAまたは二重鎖RNA鎖から解離させることにより、次のプライマーのハイブリダイゼーションを可能にする必要がある。

【0004】 二重鎖DNAのDNA交換を加熱などの変性過程を行わずに人工的に達成した例としては、ペプチド核酸 (PNA) があり (Nature Biotechnology, 14, 1700-1704 (1996) など)、このPNAを用いた新しいDNAおよびゲノム解析法が種々報告されている。しかしながら、PNAは低イオン濃度下ではDNA鎖交換を促進するが、生理的イオン濃度条件下では、その性能が極めて低下する。また、天然型DNAやRNAと異なり、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼやリガーゼなどの基質とならない問題があり、PNAによるDNAやゲノム解析に制約をもたらしているのが現状である。

【0005】 このようなPNAの問題点を克服した例としては、ペプチド-DNA複合体がある (J. Am. Chem. Soc., 121, 2012-2020 (1999))。しかしながら、 $Mg$ イオン存在下ではDNA鎖交換活性が阻害されるため、DNAポリメラーゼなどの $Mg$ イオン依存型酵素との併用が制限される。

【0006】 上述のように、生体内でRecAが行っている機能を模写し、多種多様な条件下において十分な機能を発揮できるものは報告されていない。

【0007】一方、最近、本発明者を初めとする研究者らにより、くし型 (comb-type) のコポリマーが、生体内と同等の条件下でDNA二重鎖あるいは三重鎖の形成及び安定化を促進することが報告された (Bioconjugate Chem., 8, 3-6 (1997); Nucleic Acids Sym. Ser. No. 39, 133-134 (1998); Bioconjugate Chem., 9, 292-299 (1998))。また、上記の最後の論文では、上記コポリマー、特に高度にグラフト化されたコポリマーが低イオン強度媒体中でDNA鎖間のハイブリダイゼーションが促進されることも示唆されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、人工的に二重鎖DNAあるいはRNAにおける特定部位におけるヌクレオチド配列を、それに相同なヌクレオチド配列で交換する際に、DNAやRNAの加熱などの変性過程を必要とすることなく、反応プロセスの省略あるいは短縮、その他の条件の緩和を可能とするような手段を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上述したように、ある一定のくし型コポリマーは生体内と同等の条件下でDNA二重鎖あるいは三重鎖の形成及び安定化を促進し、しかも、DNA鎖間のハイブリダイゼーションをも促進することが知られている。しかしながら、かような三重鎖DNAが特定のコポリマーによって安定化されるにもかかわらず、該コポリマーを初めとするカチオン性高分子は上記のような作用と共にまたは別個に単鎖DNAあるいはRNAと二重鎖DNAあるいはRNAとの間の鎖交換をも促進しうるものが、今回、見出された。

【0010】すなわち、本発明はかような知見に基くものである。

【0011】したがって、本発明によれば、二重鎖DNAあるいはRNAにおける特定部位のヌクレオチド配列の該配列に相同のヌクレオチド配列による交換反応を促進するための、カチオン性高分子を有効成分とする調製物が提供される。

【0012】

【発明を実施するための好ましい態様】二重鎖DNAあるいはRNAとは、相補的な塩基 (またはヌクレオチド) 対、例えば、DNAでは、アデニン (A) とチミン (T) 及びグアニン (G) とシトシン (C)、RNAでは、Aとウラシル (U) およびGとCとの対合により形成されるDNA間で、あるいはRNA間で形成された高次構造を保ちうる鎖を意味する。本発明の文脈上、このようなDNAあるいはRNAは生体成分から単離されたものであっても、また単離されることなく、生体組織中に存在するものであってもよい。勿論のこと、合成された二重鎖DNAあるいはRNAも包含される。

【0013】かようなDNAあるいはRNAにおける特定部位のヌクレオチド配列とは、直鎖状になったDNAあるいはRNAの末端部位あるいは中間部位等のいかなる部位のヌクレオチド配列であってもよい。また、該配列に相同のヌクレオチド配列とは、配列を構成する塩基が実質的に同一であることを意味する。実質的に同一とは、上記特定部位のヌクレオチド配列とそれに対する相同配列はA、T、G及びCのそれぞれが少なくとも95%は連続する配列順において同一であるか、あるいはそのような配列においてTがUに置き換えられている場合をいう。

【0014】したがって、交換反応は、相補的な二本の鎖からなる二重鎖DNAまたはRNAが、二本の鎖のうちの一本の鎖における特定部位のヌクレオチド配列がそれに相同のヌクレオチド配列を有する単鎖DNAまたはRNAにより交換されることが意図されている。具体的な交換の様式としては、二重鎖DNAの特定部位のヌクレオチド配列が単鎖DNAあるいはRNAにおける相同のヌクレオチド配列により交換されるか、あるいは二重鎖RNAの特定部位のヌクレオチド配列が単鎖DNAあるいはRNAにおける相同のヌクレオチド配列により交換される場合が挙げられる。

【0015】単鎖DNAあるいはRNAにおける相同のヌクレオチド配列は、該単鎖DNAあるいはRNA分子全体を占めるものであっても、一部分を占めるものであってもよいが、一般的に全体を占めるものを強く意図している。

【0016】交換あるいは交換反応とは、二重鎖DNAあるいはRNAの特定部位のヌクレオチド配列が、該配列に相同の単鎖DNAあるいはRNAにヌクレオチド配列により単に入れ替わり再構成されることを意味し、生来の特定部位のヌクレオチド配列の切断除を伴うものではない。

【0017】本発明に従えば、このような交換反応は、カチオン性高分子の存在下で効率よく起こすことができる。カチオン性高分子としては、上記交換反応に資するものであればいかなるポリマーであってもよいが、例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン等のアミノ酸、グルコサミン等の糖、エチレンジイミン、ジエチルアミノエチルメタクリレート、ジメチルアミノエチルメタクリレート等の合成モノマー等のカチオン性基を形成しうるモノマーに由来するカチオン性ホモポリマー及びコポリマーを挙げることができる。

【0018】カチオン性高分子は、さらに、上記のカチオン性ホモポリマーあるいはコポリマーが親水性高分子で側鎖修飾されたグラフト型構造を有するものが好ましい。このような側鎖 (グラフト鎖) としては、ポリエチレングリコール等の水溶性ポリアルキレングリコール、デキストラン、プルラン、アミロース、アラビノガラクトサン等の水溶性多糖、セリン、アスパラギン、グルタミ



(4)

特開2001-78769

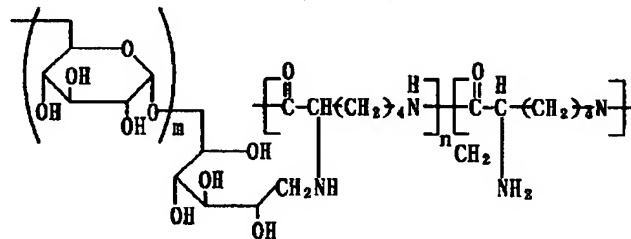
5

ン、スレオニン等の親水性アミノ酸を含む水溶性ポリアミノ酸、アクリルアミド及びその誘導体をモノマーとして用い合成される水溶性高分子、メタクリル酸及びアクリル酸並びにその誘導体（例、ヒドロキシエチルメタクリレート）をモノマーとして用い合成される水溶性高分子、ポリビニルアルコール及びその誘導体からなる群より選ばれる1種以上の水溶性高分子により形成されるものを挙げることができる。

【0019】より好ましいカチオン性高分子としては、例えば、上記Bioconjugate Chem., 9, 292-299 (1998)に記載されているような下記の一般式で表されるものを挙げることができる。

【0020】

【化1】

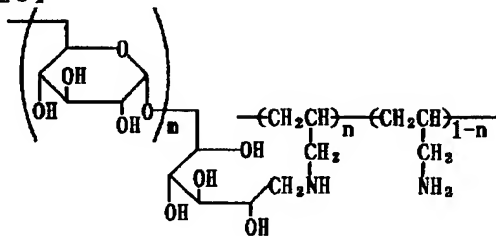


【0023】デキストラン側鎖修飾ε-ポリ（L-リジン）

（以下、ε-PLL-g-Dexと略記する）

【0024】

【化3】

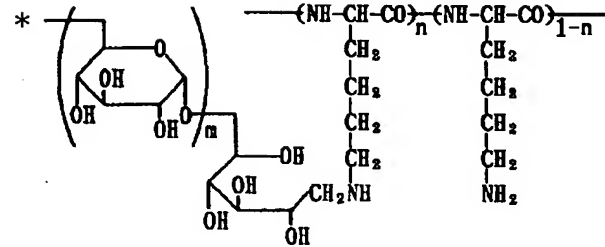


【0025】デキストラン側鎖修飾型ポリアリルアミン（以下、PAA-g-Dexと略記する）

上記のカチオン性高分子のうち、特に、α-PLL-g-Dex及びε-PLL-g-Dexが本発明において好ましく使用できる。

【0026】かようなカチオン性高分子の分子量、また、側鎖修飾基それ自体の鎖長及びグラフトの程度は、具体的な使用目的により最適な値が変動するので限定できないが、当業者であれば、後述の実施例を参照に各最適値を選択することができるであろう。

【0027】本発明に従えば、上記カチオン性高分子を有効成分とする調製物が提供されるが、かような調製物は、目的とする交換反応に悪影響を及ぼさない限り、合成された高分子の粗製物あるいは精製された高分子と、必要により、緩衝剤、生理食塩水等から構成することが



【0021】デキストラン側鎖修飾α-ポリ（L-リジン）

（以下、α-PLL-g-Dexと略記する）

【0022】

【化2】

できる。また、高分子は1種または2種以上の混合物であってもよい。

【0028】このようなカチオン性高分子は、本発明に従う交換反応においては、一般的に、交換反応に供される総（単鎖+二重鎖）DNAあるいはRNAにおけるホスフェートに対するカチオン性基の荷電比が0.1以上、好ましくは0.5~1000となるように選ばれる。

一方、被交換反応に供される二重鎖DNAあるいはRNAに対する単鎖DNAあるいはRNAのモル比率は約5を超えるように選ぶことが有利である。

【0029】交換反応は、二重鎖DNAあるいはRNAが熱変性しないような温度で行うことができ、ATPやMg<sup>2+</sup>などの補助因子を必要とすることなく行うことができる。上記温度は、生物細胞等に悪影響が生じない生理的に許容できる温度、例えば、約5℃~約40℃であることが好ましい。

【0030】本発明に従うカチオン性高分子は、上記の条件下で二重鎖DNAあるいはRNAにおける特定部位のヌクレオチド配列を単鎖DNAあるいはRNAの相同のヌクレオチド配列で効率よく交換できる。オリゴヌクレオチドは、5mer以上であれば理論上いかなる鎖長のものでよい。なお、好ましくは10mer以上500mer以下の配列に本発明は適用できる。したがって、本発明のカチオン性高分子の調製物は、例えば、二重鎖DNAやRNAに対するプライマーやプローブまたは、それ自体既知の標識や医薬等を担持するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、次いで二重鎖DNAあるいはRNAの特定部位にハイブリダイズしたプラ

イマーやプローブまたはオリゴヌクレオチドの機能を利用するPCR及びRT-PCRプロセスやDNAチップを用いるプロセス、蛍光in situハイブリダイゼーションを利用する核酸分析において有用である。

【0031】また、2重鎖構造を持つmRNA上へ特定の部位に対し、その相補的配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、デオキシリボザイム、3重鎖形成用オリゴヌクレオチドとの交換を促進し、これらオリゴヌクレオチドの遺伝子制御機能を向上させる上でも本発明によるカチオン性高分子は有用である。さらに、ゲノムDNA 2重鎖上の特定の部位との相補的ヌクレオチド鎖の交換を生じさせることにより、(DNA結合性タンパク質の結合を調整し)複写および転写課程を制御する上でも有用である。

【0032】

【実施例】以下、理解を容易にするため、二重鎖オリゴヌクレオチドと単鎖オリゴヌクレオチドの交換反応を挙\*

表-1 実際に使用したオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド		配列
ODN E-1	5'-ATGCTGAGCAAGGCGAGGA-3'	
ODN E-2	3'-TAOCCACTCGTTCCCGCTCCT-5'-FITC	
ODN E-3	5'-TCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3'	

【0035】 $\alpha$ -PLL-g-Dexは、その合成、精製、分析を上記Bioconjugate Chem., 8, 3-6, (1997)に従って行って得られたカチオン性ポリマーを用いた。

【0036】DNA交換実験は以下の手順で行った。

1.54  $\mu$ Mの二重鎖DNA (duplex) 溶液10  $\mu$ L (※30 [数1] (【アミノ基】ポリマー / 【ホスフェート】DNAの荷電比))

【0038】が2になるようにポリマーを添加した。さらに、最終的に10mMとなるようにMgCl<sub>2</sub>を添加し、各DNA溶液が25  $\mu$ Lとなるように緩衝溶液を添加した。この各サンプル溶液を37℃及び15℃でインキュベートした。所定時間後サンプルチューブを氷冷することによりDNA鎖交換反応を停止した。その後、DNAとポリマーを解離させる目的で、サケ精子DNA (5  $\mu$ L, 1.7mg/mL)を添加した。DNA交換量は、サンプルをTBE緩衝溶液中13%ポリアクリルアミド電気泳動(100V/cm, 2時間)し、蛍光標識された二重鎖DNAのフラクションをBiofil Bioimage Analyserで解析することにより求めた。また、DNA交換率は、以下の式-1により算出した。

【式1】

DNA鎖交換率(%) = (1 - [反応後の2重鎖の蛍光強度] / [反応前の2重鎖の蛍光強度]) × {(2重鎖のモル数 + 単鎖のモル数) / (単鎖のモル数)} × 10

\* げて本発明を具体的に説明するが、これらの反応は長鎖の二重鎖DNAあるいはRNAと単鎖DNAあるいはRNAとの間でも、同様に起こるものと理解されている。

【0033】実施例1:  $\alpha$ -PLL-g-Dexによる単鎖DNAと二重鎖DNAとの間でのDNA鎖交換

下記表-1のオリゴヌクレオチドをHokkaido System Scienceから購入し、高速液体クロマトグラフィーにより精製した。精製済みオリゴヌクレオチドを10mMの磷酸緩衝液(0.5mM EDTA, 150mM NaCl, pH7.2)に溶解し、UVスペクトロスコピー(Beckman DU 600)にてUV吸収測定することにより、DNA濃度を決定した。表-1のE-1とE-2の相補的配列を有するDNAを等モル(1.54  $\mu$ M)混合し、アニーリングすることにより、二重鎖DNAを調製した。

【0034】

【表1】

※  $\mu$ Lに一定量の単鎖DNAを添加し、[単鎖DNA] / [二重鎖]のモル比率が5になるようにDNA溶液を調製した。このDNA混合溶液に、ポリマーアミノ基のDNA中ホスフェート基に対するモル比

【0037】

【数1】

0

結果を図1に示す。37℃においては、 $\alpha$ -PLL-g-Dexが存在しない場合、30分インキュベートしても二重鎖DNA中のFITC-ラベルDNAの30%が相等的単鎖DNAによって交換されたのみであったのに対し、 $\alpha$ -PLL-g-Dex存在下においては、5分のインキュベーションでもDNA鎖交換率が90%に達した。また、15℃で同様の実験を行ったところ、 $\alpha$ -PLL-g-Dexが存在しない場合においては、DNA交換率50%に達するのに24時間以上必要であったのに対して、 $\alpha$ -PLL-g-Dexが存在下においては、1時間でDNA交換率50%に達した。

【0039】実施例2:  $\alpha$ -PLL-g-DexのDNA鎖交換促進効果に及ぼすMgイオンの効果  
実施例1と同じDNAを、10mM MgCl<sub>2</sub>を含まない緩衝溶液と含む緩衝溶液に様々な単鎖DNA / 2重鎖DNAの比になるように調製し、これに荷電比が2になるように $\alpha$ -PLL-g-Dexを加えた。このサン

ルを37℃で30分インキュベート後、実施例1と同様な方法でDNA交換率を求めた。

【0040】結果を図2に示すが、Mgイオンの存否に関わらず $\alpha$ -PLL-g-Dexが優れたDNA鎖交換促進能を有することが明らかになった。

【0041】実施例3： $\alpha$ -PLL-g-Dex、 $\alpha$ -ポリ(L-リジン) ( $\alpha$ -PLL) 及び $\epsilon$ -ポリ(L-リジン) ( $\epsilon$ -PLL) によるDNA鎖交換の比較

$\alpha$ -PLL及び $\epsilon$ -PLLは、シグマアルドリッチジャパンおよび和光純薬工業より購入したものをを用いた。 $\alpha$ -PLL-g-Dexは、実施例1と同様のものをを用いた。一方、DNA鎖交換反応は、ポリマーの添加量及び反応時間以外は実施例1と同様に行った。すなわち、ポリマーは、系中に存在するDNAに対するポリマーの電荷比が、0.5、1及び5になるように添加し、反応時間30分で交換反応を施したのち、DNA鎖交換率を求め

表-2 実験に供したPLL-g-Dex

ポリマー	リジン残基に対するDex導入率 (%)
$\alpha$ -PLL-g-Dex (5)	5
$\alpha$ -PLL-g-Dex (8)	8
$\alpha$ -PLL-g-Dex (15)	15

表-3 実験に供したPAA-g-Dex

ポリマー	リジン残基に対するDex導入率 (%)
PAA-g-Dex (5)	5
PAA-g-Dex (8.5)	8.5
PAA-g-Dex (11.5)	11.5

【0045】DNA鎖交換反応及び評価は、使用したポリマー (表-2、表-3) 以外は実施例3と同様に行った。

【0046】結果を図4に示す。いずれのDex含量およびいずれの電荷比においても $\alpha$ -PLLを主鎖に持つ $\alpha$ -PLL-g-Dexの方が、PAAを主鎖に持つPAA-g-DexよりDNA鎖交換促進能が高いことが明らかとなった。

【0047】実施例5：他のカチオン性化合物と $\alpha$ -PLL-g-DexのDNA鎖交換促進能の比較二重鎖DNAを安定化することが知られているスペルミン (および相補的DNA鎖の単鎖からのハイブリダイゼーションを著しく促進することが知られているカチオン性界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) (Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 88, 8237-8241 (1991))、 $\alpha$ -PLL-g-Dexと $\epsilon$ -PLL-g-Dexの比較を行っ

\*た。

【0042】結果を、図3に示す。 $\alpha$ -PLL-g-Dexでは電荷比0.5で約90%の交換率を示したのに対して、 $\alpha$ -PLLでは約60%、 $\epsilon$ -PLLでは40%と交換効率が低かった。しかし、いずれのPLLでも、添加量を増やし電荷比5にすると、 $\alpha$ -PLL-g-Dex (電荷比0.5のとき) と同等の交換率を示した。

【0043】実施例4： $\alpha$ -PLL-g-DexとPAA-g-DexのDNA鎖交換促進能の比較

上記Bioconjugate Chem., 8, 3-6, (1997)に記載の方法により、種々 $\alpha$ -PLL-g-Dexを合成した (表-2)。また、PAA-g-DexはPAA (日東紡績) とデキストランから $\alpha$ -PLL-g-Dexと同様の手法で合成した (表-3)。

【0044】

【表2】

た。なお、 $\epsilon$ -PLL-g-Dexは、出発物質として $\epsilon$ -PLLを用い、 $\alpha$ -PLL-g-Dex同様に合成した。スペルミンおよびCTABはシグマアルドリッチジャパンより購入し、実施例3と同様な方法でDNA鎖交換反応および評価を行った。

【0048】結果を図5に示す。 $\alpha$ -PLL-g-Dexがもっとも効果的に鎖交換反応を促進することがわかった。

【0049】

【発明の効果】以上本発明により、これまで変性を必要としたPCRなどDNAやRNAのハイブリダイゼーションにおいて、プロセスの短縮、条件の緩和、さらには、非特異的結合を押さえることにより効率を向上させ、さらには、DNA鎖及びRNA鎖交換やインキュベーションの機能向上に伴う、アンチセンスDNA/RNA、リボザイムおよび三重鎖形成性オリゴヌクレオチド等による遺伝子発現調節機能の向上を可能にする。

【0050】

\* \* 【配列表】

<110> 丸山 厚  
 Atsushi, Maruyama  
 <120> ヌクレオチド配列間の交換を促進するためのカチオン性高分子調製  
 物  
 <130> 9909038  
 <160> 2  
 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 1  
 atggtgagca agggcgagga 20  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 2  
 tcctcgccct tgctcaccat 20

【図面の簡単な説明】

【図1】 $\alpha$ -PLL-g-DexのDNA交換反応に関する結果を示す。Dexで側鎖修飾したPLL-g-Dexが、きわめて良好なDNA鎖交換促進能を有することを示す図である。

【図2】 $\alpha$ -PLL-g-DexのDNA鎖交換反応促進効果をMgイオン存否において検討した結果である。 $\alpha$ -PLL-g-DexのDNA鎖交換反応促進効果は、Mgイオンの存否に関わらず高く保持されていることがわかる。

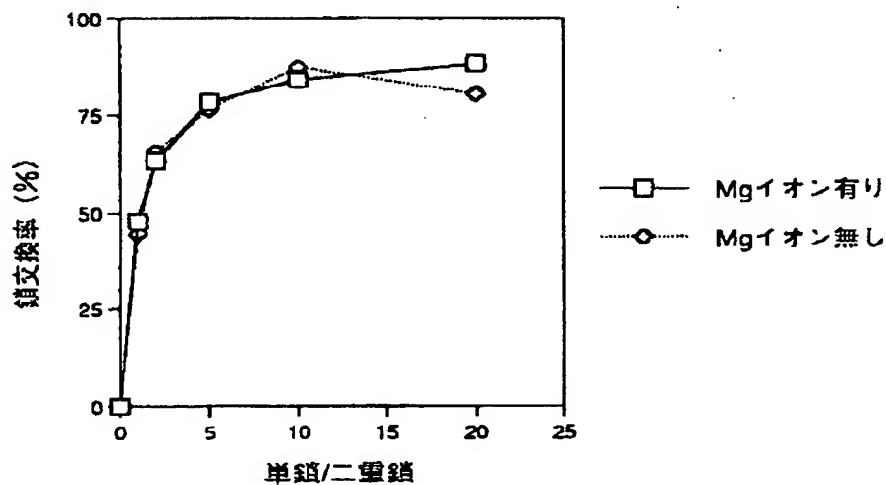
【図3】PLL、 $\epsilon$ -PLL及び $\alpha$ -PLL-g-DexのDNA交換試験に関する結果を示す。PLL、 $\epsilon$ -PLLもDNA鎖交換能を有するが、 $\alpha$ -PLL-g-Dex ※

20※がより優れたDNA鎖交換作用を示す図である。

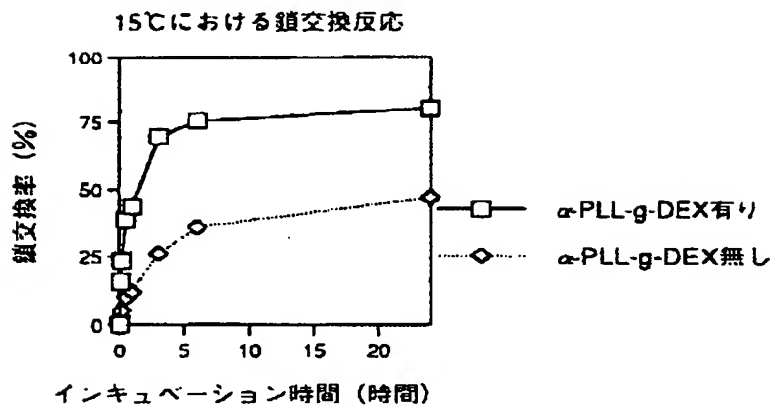
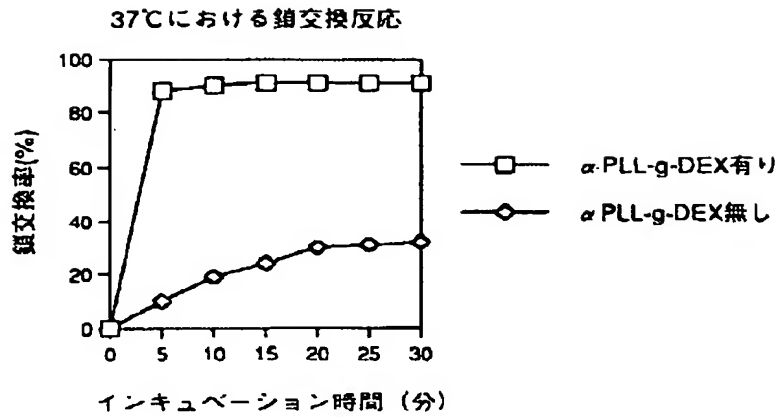
【図4】 $\alpha$ -PLL-g-DexとPAA-g-Dexの中のDNA鎖交換反応に与える影響を見たものである。PAAを主鎖とするPAA-g-Dexに比べ $\alpha$ -PLLを主鎖とする $\alpha$ -PLL-g-Dexはそのデキストラン含量に依存せず優れたDNA鎖交換促進能を発現することを示す図である。

【図5】種々のカチオン性化合物のDNA鎖交換反応に与える影響を見たものである。2重鎖安定下可能をもつスperlミンや相補的な単鎖のハイブリダイゼーションを著しく促進するCTABに比べ、 $\alpha$ -PLL-g-Dexが優れたDNA鎖交換促進能を発現することを示す図である。

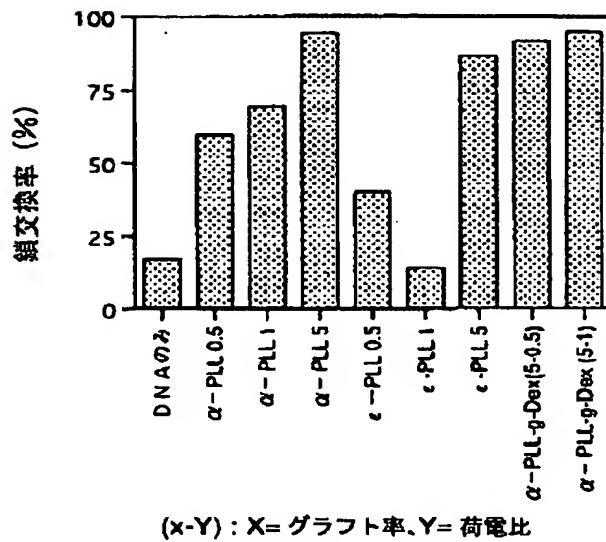
【図2】



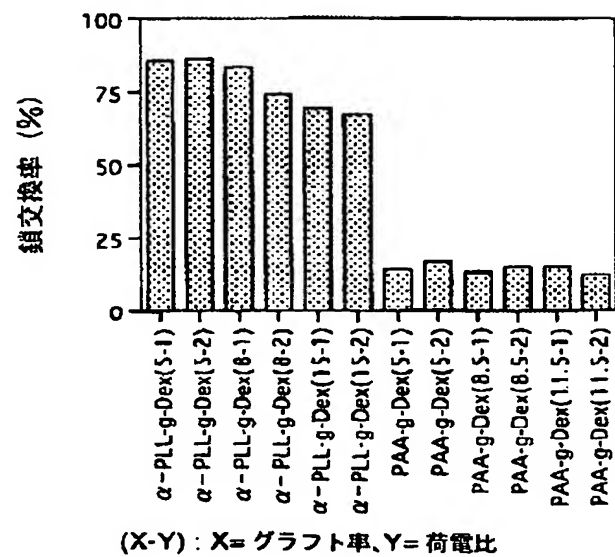
【図1】



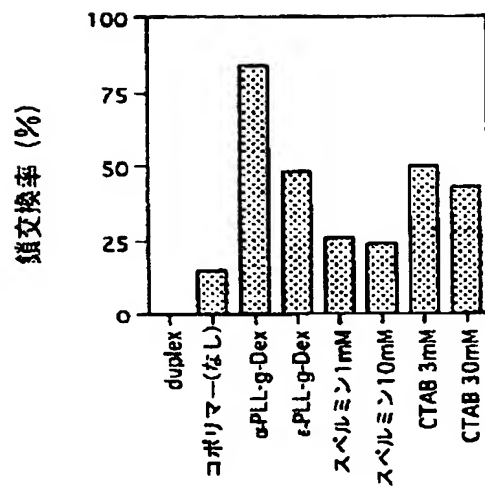
【図3】



【図4】



【図5】



---

フロントページの続き

(72)発明者 赤池 敏宏  
東京都保谷市下保谷4-15-23

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA11 FA20 HA19